

**MARIA LUIZA CLETO DAL-CÓL**

**INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DA PRIMEIRA EXPOSIÇÃO DE  
RATOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO NO AUMENTO DA  
ESQUIVA DOS BRAÇOS ABERTOS E EFEITO DO MIDAZOLAM NA  
SEGUNDA EXPOSIÇÃO**

**Florianópolis-SC**

**2002**

**MARIA LUIZA CLETO DAL-CÓL**

**INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DA PRIMEIRA EXPOSIÇÃO DE  
RATOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO NO AUMENTO DA  
ESQUIVA DOS BRAÇOS ABERTOS E EFEITO DO MIDAZOLAM NA  
SEGUNDA EXPOSIÇÃO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao curso  
de Pós-graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como  
requisito parcial à obtenção do título de Mestre  
em Neurociências**

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria**

**Florianópolis-SC**

**2002**

**"INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DA PRIMEIRA EXPOSIÇÃO AO LABIRINTO EM  
CRUZ ELEVADO NO AUMENTO DA ESQUIVA DOS BRAÇOS ABERTOS E  
EFEITO DO MIDAZOLAM NA SEGUNDA EXPOSIÇÃO".**

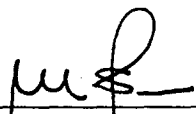
**MARIA LUIZA CLETO DAL-CÓL**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

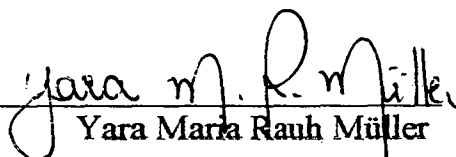
**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final  
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

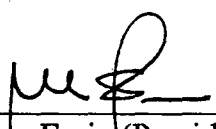
Orientador

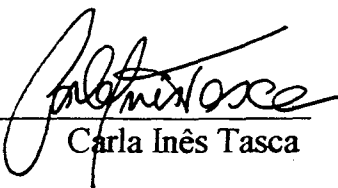
  
Moacir Serralvo Faria

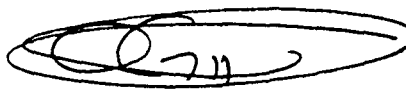
Coordenadora do Curso

  
Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora

  
Moacir Serralvo Faria (Presidente)

  
Carla Inês Tasca

  
Odival Cezar Gasparotto

*“Descobrir que um certo sentimento depende da atividade num determinado número de sistemas cerebrais específicos em interação com uma série de órgãos corporais não diminui o status desse sentimento enquanto fenômeno humano. Tampouco a angústia ou a sublimidade que o amor ou a arte podem proporcionar são desvalorizadas pela compreensão de alguns dos diversos processos biológicos que fazem desses sentimentos o que eles são. Passa-se precisamente o inverso: o nosso maravilhamento aumenta perante os intrincados mecanismos que tornam tal magia possível. A emoção e os sentimentos constituem a base daquilo que os seres humanos têm descrito há milênios como alma ou espírito humano.”*

*(Damásio, 1996, p. 16)*

**Ao meu marido Célio, pelo amor, amizade  
e companheirismo**

## AGRADECIMENTOS

A maior insegurança neste exato momento é esquecer de agradecer a alguém importante, que teve participação na realização desta dissertação. Todos foram importantes, e merecem meu sincero Obrigada.

Aos animais que involuntariamente cedem suas vidas para que a ciência dos primatas humanos possa progredir;

Ao Meu orientador, Moacir Serralvo Faria;

À banca, por ler, avaliar, e contribuir com este trabalho;

Aos colegas de Laboratório: Viviane (minha primeira guia pelo laboratório), Ana Valquíria (minha “Anja” de plantão), Lenir (a Justiceira), Isabel, Amanda, Daniel;

Aos meus colegas de disciplinas, em especial os colegas do Grupo de Estudos da disciplina de Etologia (Célio, Marcelo, Bruno e Rodrigo);

Aos professores que com toda dedicação, exigiram o máximo de seus alunos, em especial os Professores Guerra, Carla Tasca, Marino, Pádua e Cláudio Toledo;

Aos colegas da Fisiologia, com as conversas no corredor e desabafos. Aos demais professores da Fisiologia, em especial Cristina, Marta, Odival;

Aos demais amigos, não envolvidos diretamente com a dissertação e aos novos amigos de Ribeirão Preto, pelo apoio nos últimos meses;

À Maria Regina Muller, pela transformação;

Aos meus pais, por eu existir, pela minha formação;

Em especial ao Célio, colega, amigo, namorado, marido, por todo apoio, carinho e por sua imensurável ajuda na conclusão desta dissertação.

## **SUMÁRIO**

### **LISTA DE TABELAS E FIGURAS**

### **RESUMO**

### **ABSTRACT**

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Ansiedade	2
1.1. Neurobiologia da ansiedade	5
1.2. Neuroanatomia da ansiedade	6
1.3. Modelos animais	11
1.3.1. Labirinto em cruz elevado: um modelo animal de ansiedade	13
 <b>CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS</b>	 <b>22</b>
2.1. Animais	23
2.2. Labirinto em Cruz Elevado	23
2.3. Procedimento	24
2.4. Análise estatística	25
 <b>CAPÍTULO III – RESULTADOS</b>	 <b>26</b>
 <b>CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	 <b>35</b>

<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÃO</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO 1. Porcentagem de entradas nos braços abertos</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO 2. Porcentagem tempo permanência nos braços abertos.</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 3. Número de entradas nos braços fechados.</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 4. Número de entradas nos braços abertos.</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 5. Número total de entradas.</b>	<b>53</b>



## **LISTA DE TABELAS E FIGURAS**

### **INTRODUÇÃO**

<b>TABELA 1.</b> Classificação dos distúrbios de ansiedade segundo o DSM-IV	3
---	---

<b>TABELA 2.</b> Principais estruturas cerebrais que regulam o comportamento de defesa e emoções associadas (GRAEFF, 1999b)	6
---	---

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura do sistema límbico (PURVES et al, 1997)	9
--	---

<b>FIGURA 2.</b> Representação esquemática das interações entre as estruturas envolvidas no desenvolvimento do medo condicionado (adaptado de FENDT & FANSELOW, 1999).	10
--	----

<b>FIGURA 3.</b> Labirinto em Cruz Elevado (Depto. de Fisiologia/CCB/ UFSC)	16
---	----

<b>TABELA 3.</b> Análise Fatorial no Labirinto em Cruz Elevado (LISTER, 1987)	17
---	----

<b>TABELA 4.</b> Análise fatorial das exposições 1 e 2 no labirinto em cruz elevado (FILE et al, 1993)	20
--	----

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

<b>TABELA 5.</b> Grupos experimentais, com relação à exposição, droga/veículo, e o tempo de duração da primeira e da segunda sessão	25
---	----

### **RESULTADOS**

<b>FIGURA 4.</b> Porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T; gráfico B) na primeira exposição (E1) com duração de 5, 2 ou 1 minutos e segunda exposição de 5 minutos (E2) no labirinto em cruz elevado (LCE).	28
--	----

**FIGURA 5.** Número de entradas nos braços abertos (A), fechados (B), e número total de entradas (C) de ratos não-tratados, submetidos a duas exposições ao labirinto em cruz elevado (LCE). Durante a primeira exposição (E1), os ratos foram submetidos ao LCE por 1, 2 e 5 minutos. Cada grupo foi submetido a 5 minutos de segunda exposição. 30

**FIGURA 6.** Ansiólise induzida por midazolam na segunda exposição ao LCE. Ratos sem tratamento foram inicialmente submetidos a uma exposição com duração de 1, 2 ou 5 minutos. Previamente à segunda exposição, os animais foram tratados com salina ou midazolam (1,5ml/kg) i.p.. Porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%T; gráfico B). 32

**FIGURA 7.** Número de entradas nos braços abertos, fechados, e número total de entradas de ratos durante a segunda exposição ao LCE. Os animais estiveram sem tratamento durante a primeira exposição (com duração de 1, 2 ou 5 minutos), e receberam tratamento com salina ou midazolam (1,5ml/kg) 30 minutos antes da segunda exposição (com duração de 5 minutos). 33

**ANEXO 1.** Porcentagem de entradas nos braços abertos. Tabela representando a média e desvio padrão de todos os grupos, em ambas exposições. 49

**ANEXO 2.** Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos. Tabela representando a média e desvio padrão de todos os grupos, em ambas exposições. 50

**ANEXO 3.** Número de entradas nos braços fechados. Tabela representando a média e desvio padrão de todos os grupos, em ambas exposições. 51

**ANEXO 4.** Número de entradas nos braços abertos. Tabela representando a média e desvio padrão de todos os grupos, em ambas exposições. 52

**ANEXO 5.** Número total de entradas. Tabela representando a média e desvio padrão de todos os grupos, em ambas exposições. 53

## RESUMO

---

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da duração da primeira exposição (E1) no aumento da esquia dos braços abertos e no efeito ansiolítico do midazolam (MDZ) na segunda exposição (E2) ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Ratos Wistar machos foram submetidos à E1 com duração de 1, 2 ou 5 minutos. Vinte e quatro horas depois, os 3 grupos foram subdivididos, recebendo salina ou MDZ (1,5mg/Kg) i.p., e foram reexpostos ao LCE, por 5 minutos. Os resultados mostram que, quando comparadas E1 e E2 dos grupos salina, os animais submetidos à E1 de apenas 1 minuto apresentaram porcentagens de entradas semelhantes (%A), porém menor porcentagem de tempo de permanência (%T) nos braços abertos ( $p < 0,05$ ) em E2. Nos grupos com E1 igual a 2 ou 5 minutos, houve redução na %A (2',  $p < 0,05$  e 5',  $p = 0,0557$ ) e na %T (2',  $p < 0,001$  e 5',  $p < 0,05$ ) em E2. Comparando-se os grupos que receberam salina e MDZ previamente à E2, observou-se que nos grupos com E1 igual a 2 ou 5 minutos, o midazolam não alterou a %A e %T em comparação aos respectivos grupos salina. No grupo com E1 de 1 minuto submetido à administração de MDZ previamente à E2, verificou-se aumento na %A e %T ( $p < 0,05$ ), comparado ao grupo salina. Comparando-se as E2 dos grupos que receberam MDZ, verificou-se que o grupo que foi submetido à E1 de 1 minuto apresentou maior %A que os submetidos por 2 ( $p < 0,05$ ) e 5 minutos ( $p < 0,001$ ). Os dados sugerem que 2 e 5 minutos são suficientes para o aprendizado do aumento da esquia dos braços abertos e perda do efeito ansiolítico do MDZ no LCE em E2, porém 1 minuto é

insuficiente para tal aprendizado, evidenciando efeito ansiolítico do MDZ no LCE na E2.

## **ABSTRACT**

---

## **ABSTRACT**

The aim of this work was to evaluate the influence of first exposure (E1) duration in the increase of open arms avoidance and anxiolytic effect of midazolam (MDZ) at second exposure (E2) to the elevated plus-maze (EPM). Wistar male rats were exposed to an E1 of 1, 2 or 5 minutes. Twenty-four hours later, the groups were subdivided and animals received saline or MDZ (1.5mg/kg) i.p., and were re-exposed to EPM for 5 fixed minutes. When comparing E1 and E2 of saline groups, results show that the animals submitted to an 1 minute E1 had similar percentage of entries (%O), but less percentage of time (%T) into the open arms ( $p < 0.05$ ). Groups with 2 or 5 minutes of E1 showed reduction of %O (2 minutes,  $p < 0.05$  and 5 minutes,  $p = 0.0557$ ) and %T (2 minutes,  $p < 0.001$  and 5 minutes  $p < 0.05$ ). When comparing MDZ and saline groups, in 2 and 5 minutes E1 groups MDZ did not change %O and %T related to saline groups. In 1 minute E1 group MDZ before E2 increased %O and %T ( $p < 0.05$ ) when comparing to saline groups. By comparing only MDZ groups E2, it was shown that 1 minute E1 had bigger % O than 2 minutes ( $p < 0.05$ ) and 5 minutes E2 ( $p < 0.001$ ). Data suggest that 2 and 5 minutes are sufficient to the increase of open arms avoidance and ineffectiveness of MDZ at second exposure learning, but 1 minute is insufficient for that learning, showing MDZ's anxiolytic effect at second exposure.

## INTRODUÇÃO

---



## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1. ANSIEDADE

A ansiedade e o medo são considerados o primeiro sistema de defesa do animal contra estímulos ameaçadores (GRAY, 1982). Os sintomas de ansiedade incluem sentimentos de apreensão, nervosismo, agitação e tensão, além de sinais como tremores, sudorese, aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, tônus muscular e condutância da pele, entre outros (CRAIG *et al*, 1995). Enquanto o medo é focado em um conhecido perigo externo, a ansiedade é uma resposta generalizada a uma ameaça desconhecida ou conflito interno (GRAY, 1982; GRAEFF, 1996).

A ansiedade e o medo são estados que contribuem para que o organismo sobreviva a determinadas situações. A habilidade de antecipar e portanto se preparar para uma ameaça ou desafio tem feito parte da vida dos animais a milhões de anos. Quando a ansiedade se torna prolongada ou demasiadamente intensa, deixa de ser adaptativa, pois interrompe a vida normal do indivíduo com respostas inapropriadas, sendo então considerada patológica.

Existem vários tipos de desordens de ansiedade. A tabela 1 mostra a classificação dessas desordens segundo o DSM IV (Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV).

**TABELA 1.** Classificação dos distúrbios de ansiedade segundo o DSM-IV

DISTÚRBIOS DE ANSIEDADE ( DSM-IV)
Distúrbio de pânico com agorafobia
Distúrbio de pânico sem agorafobia
Agorafobia sem história distúrbio de pânico
Fobia social
Fobia específica
Distúrbio de ansiedade generalizada
Distúrbio de estresse pós-traumático
Distúrbio de estresse agudo
Distúrbio obsessivo-compulsivo
Distúrbio ansioso devido a ... (uma condição clínica específica)
Ansiedade devido ao uso de substâncias
Distúrbio de ansiedade inespecífico

No *distúrbio de ansiedade generalizada* verifica-se a persistência por seis meses ou mais de um estado de apreensão constante, de intensidade flutuante e causa não identificada, geralmente acompanhado de tensão motora e hiperatividade neurovegetativa. O *distúrbio do pânico* caracteriza-se pela ocorrência repetida (pelo menos quatro vezes em quatro semanas) de ataques de pânico, caracterizados por súbitos ataques de terror, acompanhados de intensas manifestações autonômicas (palpitação, dispnéia, tremores e tontura), acompanhadas de ansiedade antecipatória – medo de ter outro ataque de pânico, e comportamento de esquiva de lugares onde ter um ataque de pânico pode ser constrangedor (principalmente lugares públicos). As *fobias* são caracterizadas pelo medo exagerado e esquiva de situações específicas, como

lugares públicos (agorafobia), contatos sociais (sociofobia), ou objetos ou animais (fobia simples). No *distúrbio obsessivo compulsivo*, há recorrência involuntária de idéias, imagens ou impulsos repugnantes ou sem sentido (obsessão), que podem ser acompanhados por necessidade de realizar comportamentos estereotipados ou rituais para aliviar a ansiedade (compulsão). O *distúrbio de estresse pós-traumático* consiste em reviver experiências perturbadoras, em sonhos ou lembranças vívidas de imagens do passado, que invadem a consciência (*flashbacks*). São denominadas *ansiedades atípicas* as demais formas de ansiedade primária que não se enquadram nas definições anteriores (GRAEFF, 1996).

A experiência clínica tem mostrado que diferentes tratamentos farmacológicos são indicados para diferentes desordens de ansiedade. Enquanto benzodiazepínicos e agonistas serotoninérgicos são efetivos no tratamento do distúrbio de ansiedade generalizada, antidepressivos são os mais indicados para o tratamento do pânico (CHEETA *et al.*, 2000). Portanto, as diferentes desordens devem ter bases neuroanatômicas diferentes, com diferentes neurotransmissores envolvidos.

A seguir, discorreremos sobre a função e neuroanatomia da ansiedade, e modelos animais utilizados para o estudo da ansiedade/medo, em especial o Labirinto em Cruz Elevado.

## 1.1. NEUROBIOLOGIA DA ANSIEDADE

No decorrer de suas vidas, os animais são confrontados com situações que ameaçam sua integridade física e sobrevivência. Por essa razão, algumas estratégias de defesa foram selecionadas no decorrer da evolução (GRAEFF, 1994). Embora a natureza da ameaça e o perfil dos comportamentos de defesa variem de espécie para espécie, algumas estratégias padronizadas são adotadas. As estratégias padronizadas variam ainda em função dos diferentes níveis de ameaça com que o animal se defronta no seu meio ambiente (GRAEFF, 1996).

Em ratos selvagens, a estratégia de defesa contra um predador depende da possibilidade de fuga e da distância entre o predador e a presa. A fuga é uma resposta predominante quando o predador está a uma distância crítica da presa. Quando a fuga não é possível, o animal realiza ameaça defensiva, como vocalizações, mostra dos dentes, além de ataques explosivos com mordidas na região entre olhos e focinho do predador, seguida imediatamente por fuga. Em outras situações, o perigo não é facilmente identificado, como a presença de odores, ambiente excessivamente escuro ou claro, ambiente aberto e desprotegido. Nessas situações, o animal exibe comportamentos específicos direcionados à avaliação do risco (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988).

Em 1994, GRAEFF relacionou (Tabela 2, revisada em GRAEFF, 1999a) a natureza dos sinais de ameaça com a estratégia de defesa adotada, a emoção correspondente e a suposta área do sistema nervoso central envolvida. Destacam-se a amígdala, o sistema septo-hipocampal, núcleo mediano da rafe, substância periaquedutal ventral e dorsal e hipotálamo medial.

**TABELA 2.** Principais estruturas cerebrais que regulam o comportamento de defesa e emoções associadas (GRAEFF, 1999b).

<i>Tipo de ameaça</i>	<i>Potencial</i>	<i>Distante</i>	<i>Proximal</i>
<i>Estratégia Comportamental</i>	Avaliação de risco	Imobilidade tensa (Congelamento)	Ameaça/ luta/ fuga
<i>Estruturas neurais críticas</i>	Amígdala / sistema Septo-hipocampal	Amígdala/ Periaquedutal ventral	Amígdala/ Hipotálamo / Periaquedutal dorsal
<i>Emoção</i>	Ansiedade	Medo	Raiva/Pânico

## 1.2. NEUROANATOMIA DA ANSIEDADE

As emoções se expressam na forma de mudanças fisiológicas e respostas motoras estereotipadas, além de experiências subjetivas. A ocorrência das emoções está associada à ativação do sistema nervoso autônomo (simpático, parassimpático e entérico) e à atividade de certos núcleos do tronco cerebral, hipotálamo, hipocampo, amígdala (Figura 1), assim como neurônios pré-ganglionares da medula, gânglios autônômicos e efetores periféricos (PURVES *et al.*, 1997).

Em decorrência da punição, falta de reforço esperado e novidade, é observada inibição das respostas em andamento, associada a um aumento do nível de alerta, e aumento da atenção. A partir dessas observações, foi proposto o “Sistema de inibição comportamental”, modulando o comportamento

em decorrência do estímulo recebido. Segundo GRAY, 1982 a passagem de informação pelo hipocampo envolve uma espécie de “portal”, provavelmente na região do giro denteado-CA3, onde ocorre habituação aos estímulos neutros, e potenciação de estímulos reforçados ou punidos.

Na teoria de GRAY (1982), o sistema septo-hipocampal tem o papel de comparar estímulos atuais, recebidos do ambiente, com estímulos esperados, com base na experiência prévia (memória). Caso sejam correspondentes, o sistema mantém-se no modo de checagem. Caso haja discordância entre os estímulos, ou se o estímulo previsto for aversivo, o sistema passa a atuar no modo controle, com ação direta no comportamento. Para isso, é necessário que o sistema tenha acesso à previsão (memória) e ao estímulo atual. Além disso, estas duas classes de estímulos devem estar interrelacionadas, pois a previsão deve ser feita com base no ambiente. Assim, é necessário a recepção de informações sensoriais do ambiente, dos movimentos realizados pelo próprio indivíduo, a programação motora, o planejamento do comportamento. A previsão vai depender do estado atual do ambiente, do conhecimento anterior do ambiente, do próximo passo no programa motor e dos conhecimentos anteriores sobre as modificações no ambiente em decorrência de comportamentos realizados.

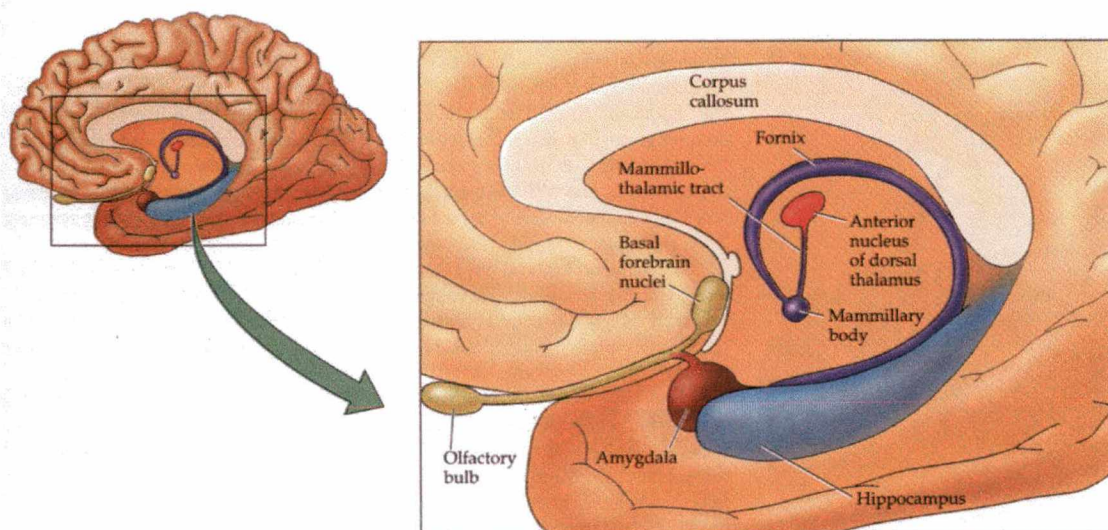
As drogas ansiolíticas bloqueiam os efeitos comportamentais de ansiedade/medo, tais como a inibição das respostas em andamento associadas a aumento do nível de alerta e aumento da atenção. Esse bloqueio ocorre, possivelmente através da inibição do Sistema de Inibição Comportamental, ou seja, desinibindo o comportamento (GRAY, 1982).

A lesão do sistema septo-hipocampal (SSH) acarreta efeitos

comportamentais semelhantes à utilização de drogas ansiolíticas, o que sugere a participação do SSH no Sistema de Inibição Comportamental (GRAY, 1982).

O medo/ansiedade de um animal perante um estímulo pode ser inato (incondicionado) ou adquirido (condicionado). Denomina-se inato um estímulo aversivo para o qual o animal é filogeneticamente preparado para reconhecer e evitar, como por exemplo um predador ou agressor da mesma espécie. O medo/ansiedade condicionado se estabelece a partir de sucessivas exposições do animal ao estímulo neutro (ex: cor), pareado a um estímulo aversivo incondicionado (ex: som aversivo ou choque). Após algumas exposições, o estímulo neutro passa a provocar reações de medo ou ansiedade semelhantes às do incondicionado.

O papel da amígdala na ansiedade e medo condicionado tem sido muito estudado nas últimas décadas, seja em roedores (GALLAGHER & CHIBA, 1996; FILE *et al.*, 1998; LEDOUX, 1998; GREBA, GIFKINS & KOKKINIDIS, 2001) ou em humanos (BECHARA *et al.*, 1999; LABAR *et al.*, 1995). BECHARA *et al.* (1999) verificaram que pacientes com lesão na amígdala apresentavam alteração na tomada de decisões em decorrência da impossibilidade de relacionar um atributo emocional (medo) com um estímulo, e citam o trabalho de Kluver & Bucy, que em 1939 demonstraram que macacos com lesão na amígdala têm tendência de se aproximarem de objetos e animais que anteriormente causavam medo (cobras, por exemplo), além de apresentarem outras alterações, como hiperoralidade, hipersexualidade e desrespeito à hierarquia. Vários estudos têm demonstrado que lesões na amígdala impedem o aprendizado do medo condicionado (LEDOUX, 1998; FILE *et al.*, 1998).



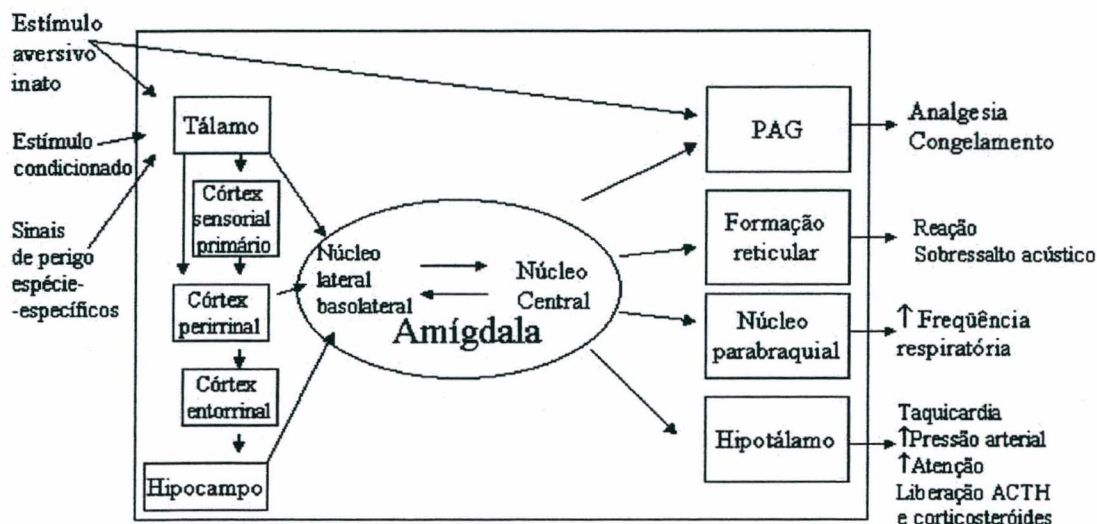
**FIGURA 1.** Estruturas do sistema límbico (PURVES *et al.*, 1997)

No medo condicionado a amígdala exerce o papel pivô (Figura 2), onde existe convergência de estímulos inatos e neutros, que serão pareados. Os núcleos lateral e basolateral da amígdala estão relacionados com a aquisição do medo condicionado (LEDOUX, 1998), que provavelmente ocorre através da potenciação de longo prazo (LTP), através do receptor glutamatérgico NMDA (N-metil D-aspartato; FENDT & FANSELOW, 1999). Estes núcleos recebem informações sobre os estímulos através de conexões com o tálamo (estímulo condicionado e incondicionado simples – sem influência cortical), córtex perirrinal (processamento de informações complexas) e formação hipocampal (informação contextual). Estas informações são retransmitidas ao núcleo central da amígdala, através de neurotransmissão glutamatérgica. As projeções eferentes do núcleo central da amígdala envolvem várias áreas cerebrais. Dentre elas, a substância cinzenta periaquedutal (analgesia, “congelamento”); a formação reticular (sobressalto acústico); o hipotálamo (taquicardia, aumento da pressão artéria, atenção, vigilância, liberação de



ACTH e corticosteróides); e o núcleo parabraquial (aumento da frequência respiratória) (LEDOUX, 1998; FENDT & FANSELOW, 1999; PURVES et al, 1997).

Assim, a amígdala possui aferências visuais, somatosensoriais e auditivas processadas por estruturas superiores, e também diretamente de núcleos talâmicos (LEDOUX, 1998; PURVES *et al.*, 1997), o que possibilita uma reação mais rápida em situação de perigo (LEDOUX, 1998).



**FIGURA 2.** Representação esquemática das interações entre as estruturas envolvidas no desenvolvimento do medo condicionado (adaptado de FENDT & FANSELOW, 1999).

### 1.3. MODELOS ANIMAIS

O termo *modelo animal*, desde os primórdios da neuropsicofarmacologia, vem denotando a tentativa de reproduzir uma desordem psiquiátrica em animais de laboratório. Esta tentativa encontra muitas dificuldades e limitações, em parte porque apesar das aparentes similaridades, as desordens psiquiátricas são definidas em termos subjetivos, e suas definições sofrem constantes revisões, redefinições e novas categorizações (GEYER & MARKOU, 1995).

Além do estudo de uma condição em si, outro propósito dos modelos animais é proporcionar uma forma de estudar sistematicamente os efeitos de tratamentos potencialmente terapêuticos. Inicialmente, o comportamento no modelo pretende refletir a eficácia de agentes terapêuticos conhecidos, mas desta forma pode levar à descoberta de novas farmacoterapias. Os modelos animais são desenvolvidos e validados por critérios previamente estabelecidos pela literatura (GEYER & MARKOU, 1995; WILLNER, 1984, 1997) .

Assume-se comumente que existem homologias, ou ao menos analogias, entre as características fisiológicas e comportamentais de várias espécies. Desta forma, extrapolações podem ser feitas dos animais para os humanos. Na pesquisa neurobiológica o propósito de um modelo é, comumente, promover o entendimento de uma condição humana através da elucidação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes a esta condição (GEYER & MARKOU, 1995)

Existem alguns critérios básicos que um modelo deve satisfazer para que seu valor seja reconhecido na pesquisa neurobiológica básica. Dentre eles,

a confiabilidade, a validade de predição, validade de expressão (analogia) e validade etiológica (homologia)(GEYER & MARKOU, 1995; GRAEFF, 1999a).

A confiabilidade refere-se à consistência e estabilidade na qual a variável de interesse é observada. A consistência deve ser evidente na habilidade de medir as variáveis objetivamente, pouca variabilidade "intra-indivíduo" e entre indivíduos, reprodutibilidade do fenômeno sob circunstâncias similares e reprodutibilidade dos efeitos das manipulações (GEYER & MARKOU, 1995).

A validade da predição é a correspondência entre o efeito das drogas no modelo e na clínica, a habilidade do modelo de identificar drogas com valor terapêutico potencial em humanos. Porém, apenas esta utilização ignoraria outros aspectos importantes, como a identificação das variáveis que influenciam tanto o modelo animal, quanto o fenômeno modelado, aumentando a compreensão sobre o fenômeno em questão (GEYER & MARKOU, 1995; GRAEFF, 1999a; WILLNER, 1984, 1997) .

Um modelo tem validade etiológica (homologia) quando a etiologia do fenômeno em animais é a mesma que nos humanos. Neste caso, o modelo se torna extremamente útil no desenvolvimento de novos tratamentos. Em desordens psiquiátricas, a etiologia muitas vezes não é conhecida, o que limita a validação das hipóteses. Neste caso, o modelo pode ser desenvolvido para identificar ou testar hipóteses sobre a etiologia. O processo de validação etiológica dos modelos animais é um componente fundamental da investigação científica (GEYER & MARKOU, 1995; GRAEFF, 1999a) .

A validade de expressão (analogia) se refere à similaridade entre o comportamento exibido no modelo animal e os sinais exibidos em condições



humanas (GEYER & MARKOU, 1995; GRAEFF, 1999a; WILLNER, 1984, 1997). Como os modelos animais envolvem a utilização de outras espécies, não se pode esperar que diferentes espécies exibam um comportamento idêntico, porém a validade de expressão fornece um ponto inicial para o desenvolvimento do modelo animal (GEYER & MARKOU, 1995) .

### **1.3.1. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: UM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE**

Os modelos animais de ansiedade são desenvolvidos tipicamente para produzir medo e elicitare comportamentos de esquiva de estímulos aversivos. (CRAIG *et al*, 1995).

Uma questão importante com relação aos modelos de ansiedade, é o discernimento entre traço de ansiedade e estado de ansiedade. O estado de ansiedade é experienciado em um momento particular, e é aumentado com a presença de um estímulo ansiogênico (gerador de ansiedade). O traço de ansiedade dura longos períodos, e é considerado como característica do indivíduo (FILE, 1992). Os modelos animais podem ser utilizados em uma população não selecionada de animais, o que possibilita estudos da eficácia de tratamentos potencialmente ansiolíticos. A maior parte das pesquisas em farmacologia comportamental tem como foco as alterações no estado de ansiedade induzidas por drogas, onde o animal é confrontado com uma situação que provoque ansiedade, e desta forma o efeito da droga de interesse pode ser avaliado. Porém, estes tratamentos podem não trazer benefícios duradouros em pacientes cronicamente ansiosos (LISTER, 1990).

A validação farmacológica, por si só, não faz de um teste um modelo de ansiedade. Várias drogas ansiolíticas, por exemplo, causam outros efeitos comportamentais, como sedação, amnésia anterógrada, ataxia, relaxamento muscular ou indução de hipotermia. O fato de um ansiolítico estar ativo em um paradigma não significa necessariamente que o paradigma está verificando a ansiólise; pode estar sensível a outros efeitos da droga. Existem vários paradigmas para verificar o efeito de drogas sobre a ansiedade. Alguns são mais aceitos que outros, e alguns paradigmas não propostos como modelos de ansiedade algumas vezes geram resultados que podem ser discutidos com relação à ansiedade (LISTER, 1990).

A maior parte dos modelos de ansiedade utilizam o comportamento exploratório do animal, explícita ou implicitamente. O comportamento de um animal exposto a uma nova situação resulta em um conflito entre uma tendência exploratória (motivada por curiosidade ou tédio) e uma tendência à esquiva (motivada pelo medo), o que pode ser considerado um conflito entre aproximação e esquiva (LISTER, 1990; MONTGOMERY, 1955). Essa situação de conflito tem sido considerada análoga à ansiedade (GRAY, 1982).

O Labirinto em cruz elevado - LCE (HANDLEY E MITHANY, 1984 - Figura 3) é um dos modelos animais mais utilizados no estudo da ansiedade (RODGERS *et al.*, 1997; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000). O LCE é um modelo muito utilizado por ser sistematicamente avaliado quanto à sua validade etiológica, de expressão e predição (RODGERS, 1997; LISTER, 1987; PELLOW *et al.*, 1985). Além disso, é um modelo rápido, simples, de baixo custo e utiliza estímulos aversivos "naturais" aos roedores (espaço aberto, elevação), evitando choques elétricos e privação de água ou alimento

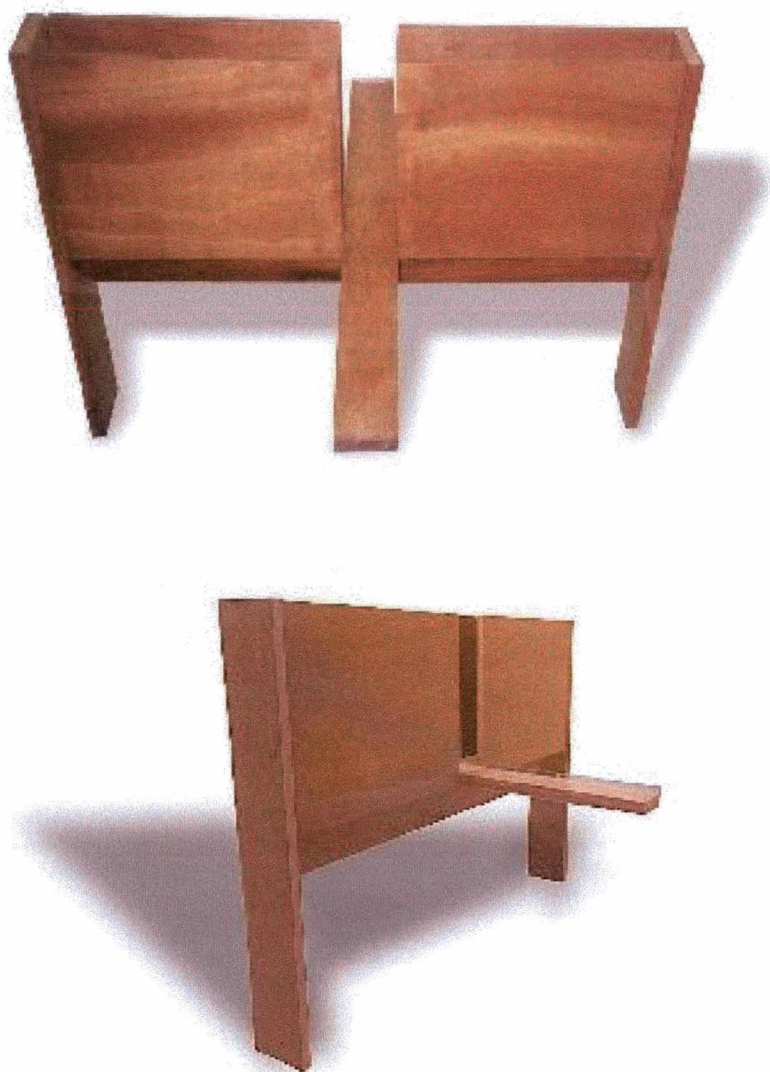


(DAWSON e TRICKLEBANK, 1995).

O LCE teve como base um labirinto em “Y” utilizado por MONTGOMERY (1955), contendo dois braços abertos e um braço fechado por paredes laterais, elevado do chão. Durante a exploração no labirinto em “Y”, os animais exibiam maior exploração do braço fechado do que dos abertos. Através de uma visão etológica, atribuiu-se essa preferência a uma potencialidade dos braços abertos em causar medo nos animais. A característica aversiva dos braços abertos tem sido reforçada por estudos demonstrando que a exposição forçada a esse tipo de braço promove maior elevação no nível sérico de corticosterona e ocorrência de comportamentos relacionados à ansiedade, como “congelamento” e defecação, quando comparada aos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985).

Montgomery também propôs que em ambiente não familiar, no caso o labirinto, o animal experiencia um conflito entre pulsão de exploração dos braços abertos (possível curiosidade) e pulsão de esquia (motivada por medo) (MONTGOMERY, 1955).

Em 1984, HANDLEY e MITHANI desenvolveram um labirinto elevado simétrico, com dois braços abertos e dois braços fechados, o Labirinto em cruz elevado (LCE). O intuito era de que o labirinto fosse sensível a drogas ansiolíticas [com sentido figurado “o que decompõe a ansiedade” (GRAEFF, 1999b)] e ansiogênicas (“geradoras, potencializadoras” de ansiedade), cujos efeitos seriam avaliados em termos de entradas e permanência nos braços abertos como taxas simples (porcentagem de braços abertos / total de entradas) (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000).



**FIGURA 3.** Labirinto em cruz elevado do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia CCB/ UFSC.

Uma análise fatorial realizada por LISTER, em 1987, com camundongos (tabela 3) nos mostra que as categorias clássicas utilizadas no labirinto em cruz elevado estão relacionadas com 2 fatores. Na tabela 3 podemos verificar que o número de entradas nos braços abertos, o tempo despendido pelo animal nos braços abertos, a porcentagem de entradas nos braços abertos e porcentagem

de tempo despendido nos braços abertos estão incluídas no fator 1.

O número de entradas e o tempo despendido nos braços fechados mostram-se relacionados a um fator 2. O total de entradas está relacionado tanto ao fator 1, quanto ao fator 2, sendo considerada uma medida inapropriada (FILE, 1992).

**TABELA 3.** Análise fatorial no labirinto em cruz elevado (valores abaixo de 0,3 não foram incluídos - LISTER, 1987)

	Fator 1	Fator 2
Nº entradas em braços abertos	0,93	-
Tempo nos braços abertos	0,96	-
Nº entradas em braços fechados	-	0,94
Tempo nos braços fechados	-0,91	-
Total de entradas	0,50	0,84
Tempo total	-	0,84
% entradas nos braços abertos	0,86	-
% tempo nos braços abertos	0,97	-

Como as drogas reconhecidamente ansiolíticas alteram as variáveis relacionadas ao fator 1, a “porcentagem de entradas” e “tempo gasto nos braços abertos” são consideradas inversamente relacionadas ao nível de ansiedade, ou seja, quanto maiores os valores das variáveis, menor a ansiedade e vice-versa; as variáveis “número de entradas nos braços fechados” e “número total de entradas”, são consideradas relacionadas à atividade locomotora e exploração do labirinto, respectivamente (FILE, 1992; PELLOW *et al.*, 1985).



Assim, se um tratamento aumenta a exploração dos braços abertos, sem alterar o número de entradas nos braços fechados, é considerado ansiolítico; se aumenta a esquiva dos braços abertos, sem alterar o número de entradas nos braços fechados, é considerado ansiogênico (gerador de ansiedade) (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1990). Caso haja redução das entradas nos braços fechados, existe a possibilidade de sedação pelo medicamento.

Até o início da década de 90 pensava-se que repetidas exposições ao labirinto não alteravam o comportamento dos animais no mesmo. Nesta época, experimentos utilizando drogas benzodiazepínicas em várias exposições ao labirinto mostraram que as mesmas perdiam seu efeito ansiolítico no labirinto a partir da segunda exposição. Sugeriu-se, então, que esta perda de efeito ansiolítico era devida à tolerância do animal à droga. Por isso, este fenômeno foi denominado “*one-trial tolerance*” (FILE, 1990). Porém, posteriormente utilizando um modelo de tolerância a choques, FILE & ZANGROSSI (1993) verificaram que o diazepam teve efeito ansiolítico tanto na primeira exposição quanto na segunda, mostrando não haver tolerância à droga de uma exposição para outra.

Além disso, evidenciou-se que na reexposição dos animais ao labirinto em cruz elevado existe uma alteração no comportamento, mesmo na ausência de drogas, caracterizado por maior esquiva dos braços abertos na segunda exposição (FILE & ZANGROSSI, 1993; RODGERS *et al.*, 1996; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000). TREIT *et al.*, 1993, mostraram que os animais não se habituariam aos braços abertos após 18 dias de reexposição, além de manterem a ausência de efeito ansiolítico do diazepam no LCE após a primeira exposição.

Isso sugere que ocorre algum tipo de aprendizado emocional no labirinto durante a primeira exposição, que leva a um aumento da esquiva dos braços

abertos nas exposições subseqüentes.

Em uma análise fatorial, FILE *et al.* (1993) verificaram que as categorias comportamentais relacionadas à ansiedade (porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos) da primeira e da segunda exposição estão relacionadas a diferentes fatores, o que sugere que estejam sendo refletidos diferentes tipos de ansiedade (tabela 4). Assim, provavelmente outra forma de ansiedade, possivelmente um estado fóbico, está substituindo, ao invés de aumentando, a ansiedade gerada pela novidade (FILE *et al.*, 1993).

RODGERS *et al.* (1996) e ROSA *et al.* (2000) realizaram análise minuto-a-minuto do comportamento de camundongos e ratos (respectivamente) no labirinto em cruz elevado, pelo período de 5 minutos, e verificaram que após uma exploração de aproximadamente três minutos do labirinto como um todo, os animais passam a evitar os braços abertos, aumentando a preferência pelos braços fechados. Verificou-se, também, que o efeito ansiolítico do midazolam no LCE decai a partir do terceiro minuto (ROSA *et al.*, 2000), além de ser abolido na reexposição (FILE, 1990).

**TABELA 4.** Análise fatorial das exposições 1 e 2 no labirinto em cruz elevado, para ratos testados sem administração de drogas. Valores  $<0,4$  não são apresentados. FILE *et al.*, 1993

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
Exp. 1/ no. entradas braços abertos	0,81	-	-	-
Exp. 1/ tempo braços abertos	0,92	-	-	-
Exp. 1/ no. entradas braços fechados	-	-	0,76	-
Exp. 1/ tempo braços fechados	-0,97	-	-	-
Exp. 1/ tempo centro	-	-	-	0,94
Exp. 2/ no. entradas braços abertos	-	0,83	-	-
Exp. 2/ tempo braços abertos	-	0,84	-	-
Exp. 2/ no. entradas braços fechados	-	-	0,76	-
Exp. 2/ tempo braços fechados	-	-0,90	-	-
Exp. 2/ tempo centro	-	-0,67	-	0,58

RODGERS *et al.* (1996) reduziu o tempo de primeira exposição para 2 minutos com camundongos, sem utilização de drogas tanto na primeira quanto na segunda exposição, e verificou que o comportamento exibido na segunda exposição não foi alterado por essa redução, reforçando a importância dos primeiros minutos de primeira exposição na aquisição do aumento de esquia dos braços abertos.

A literatura não dispõe de estudos sobre redução do tempo de primeira exposição para 1 minuto, assim como não existem estudos com redução da primeira exposição e utilização do midazolam previamente à segunda exposição.

Assim, o objetivo de nosso trabalho foi verificar a influência da variação do tempo de primeira exposição (1, 2 ou 5 minutos) na aprendizagem do aumento da esquiva dos braços abertos e na ausência de efeito ansiolítico do midazolam (MDZ) na segunda exposição exibida por ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. Ou seja, verificar se a redução no tempo de primeira exposição impede a aquisição do aprendizado no LCE, refletindo em mesmo nível de esquiva dos braços abertos na primeira e segunda exposição. Verificar, também, a possibilidade de efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição nos ratos submetidos a menor tempo de primeira exposição.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

## CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS

Ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, pesando entre 250 e 300g, foram utilizados como sujeitos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em grupos de 5 em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm) forradas com maravalha. Os animais foram submetidos a 7 dias de adaptação ao biotério do laboratório com livre acesso à água e alimento (CR-1, Nuvilab), sob temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendendo às 06:00h). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada 48 horas), pesagem e administração de drogas. Os experimentos foram realizados no período vespertino (13:00 -16:00h) com o observador fora da sala de experimentação. O número de animais por grupo oscilou entre 15 e 17 animais.

### 2.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O LCE utilizado é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando uma cruz simétrica (quatro braços de 50cm de comprimento por 10cm de largura). Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de madeira de 40cm de altura, enquanto os braços restantes são abertos, circundados por uma borda de 1cm de acrílico transparente para reduzir a ocorrência de quedas. Na junção entre os quatro braços delimita-se

uma área central de 10X10cm. O labirinto como um todo é elevado 50cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto foram utilizadas como única fonte de iluminação do experimento.

### 2.3. PROCEDIMENTO

Cada sessão teve início com a cuidadosa colocação do animal no centro do labirinto, voltado para um dos braços fechados. Permitiu-se ao animal explorar livremente o labirinto por 5, 2 ou 1 minuto. Vinte e quatro horas após a primeira exposição, os animais receberam salina ou midazolam (MDZ 1,5mg/Kg, ROSA *et al.*, 2000) via intra-peritoneal (ip). Trinta minutos após a injeção todos foram submetidos a uma segunda exposição ao LCE, com duração de 5 minutos (Tabela 5).

As variáveis comportamentais analisadas foram: número (A) e porcentagem de entradas (%A) nos braços abertos, porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%T), bem como o número de entradas nos braços fechados (F) e total de entradas (T). “Entrada” e “Saída” dos braços foram definidas como a colocação das quatro patas do animal dentro ou fora de um braço, respectivamente.

Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada teste o labirinto foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo.

**TABELA 5.** Grupos experimentais, com relação à exposição ao labirinto, droga/veículo, e o tempo de duração da primeira e da segunda sessão.

GRUPO	PRIMEIRA EXPOSIÇÃO (sem droga)	SEGUNDA EXPOSIÇÃO <i>SAL ou MDZ</i>
5	5 min	5 min
2	2 min	5 min
1	1 min	5 min

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Apenas valores com  $p < 0,05$  foram considerados significantes.



## RESULTADOS

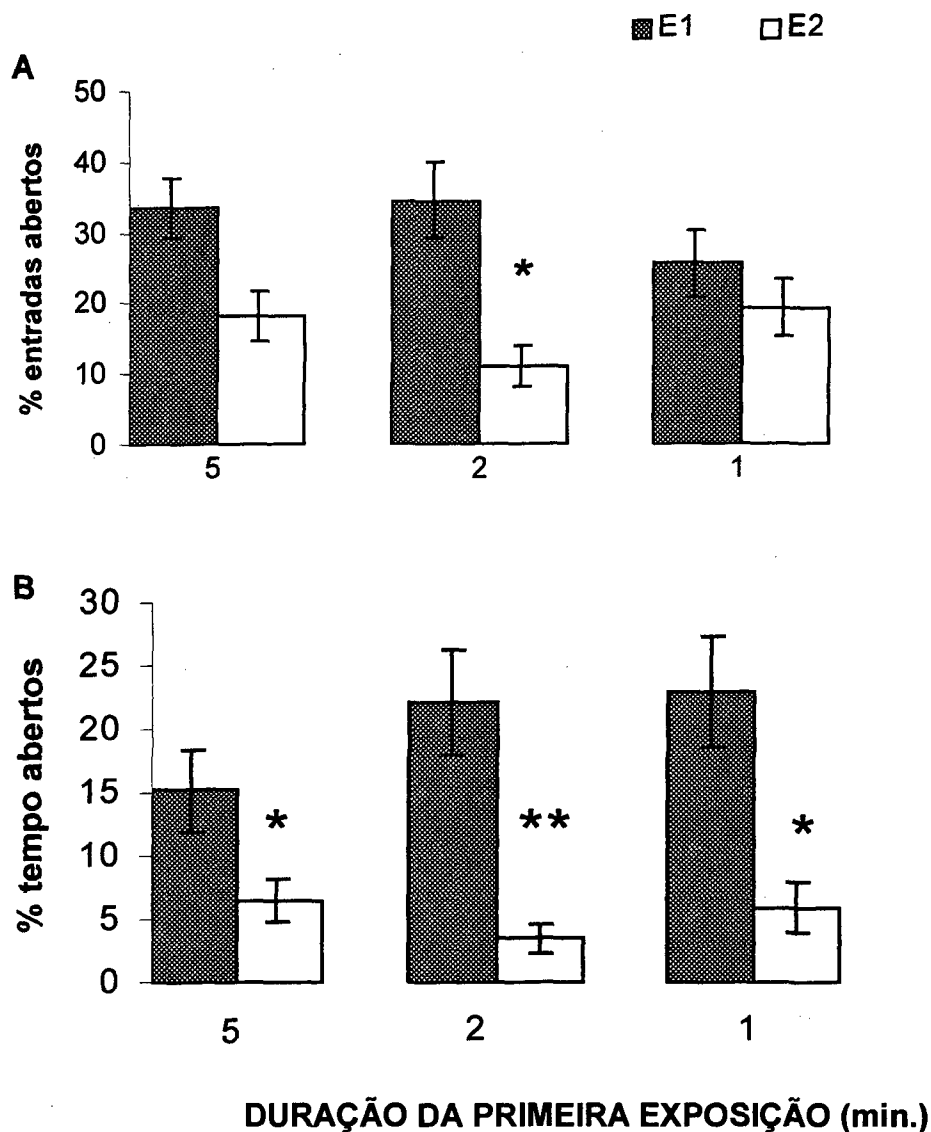
---

### CAPÍTULO III – RESULTADOS

A figura 4 mostra a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T; gráfico B) de ratos submetidos à primeira exposição (E1) com duração de 5, 2 ou 1 minutos e segunda exposição de 5 minutos (E2) no labirinto em cruz elevado (LCE), com administração de salina.

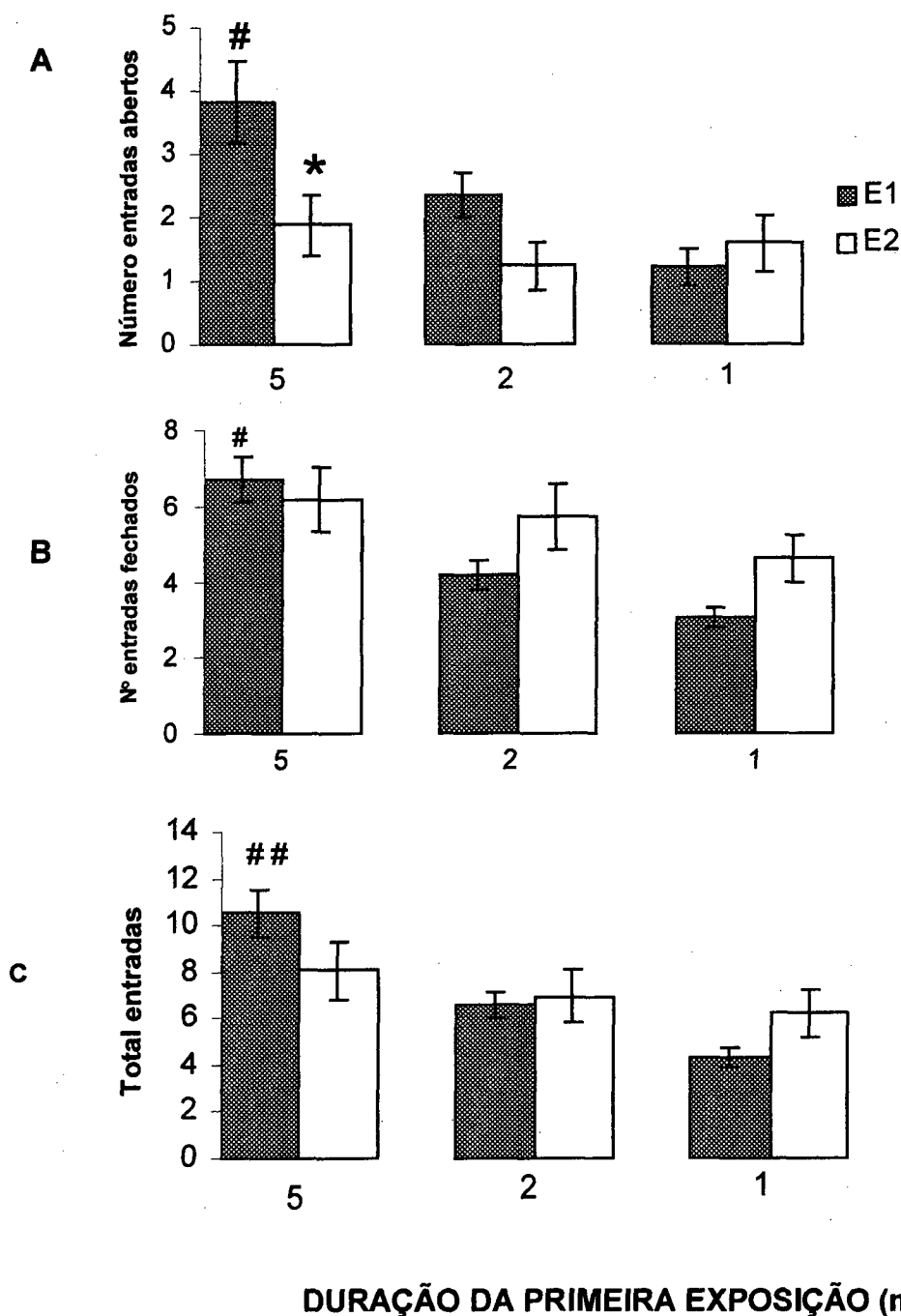
O teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações revelou que a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A) durante a segunda exposição esteve reduzida quando os ratos foram previamente expostos ao LCE por 2 minutos ( $p<0,05$ ). Quando os animais foram previamente expostos ao LCE por 5 minutos, a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A) também mostraram-se reduzidas, porém não atingiram significância estatística ( $p=0,0557$ ). Os ratos submetidos à primeira exposição de 1 minuto apresentaram uma porcentagem semelhante de entradas nos braços abertos (%A) durante as duas exposições.

A porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T) esteve reduzida na segunda exposição, independentemente da duração da primeira exposição (1,  $p<0,05$ ; 2,  $p<0,001$  e 5 minutos,  $p<0,05$ ) ao LCE.



**FIGURA 4.** Porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T; gráfico B) na primeira exposição (E1) com duração de 5, 2 ou 1 minutos e segunda exposição de 5 minutos (E2) no labirinto em cruz elevado (LCE) com administração de salina i.p., previamente à E2. Dados apresentados na forma de média  $\pm$ E.P.M.: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  em relação à primeira exposição. (Two-Way ANOVA seguida do Teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações)

A figura 5 representa o número de entradas nos braços abertos (gráfico A) e fechados (gráfico B), assim como o total de entradas (gráfico C), na primeira e na segunda exposição, dos ratos submetidos à primeira exposição com diferentes durações e reexpostos ao LCE 24 horas depois, com administração de salina previamente à E2. O teste de Neuman-Keuls revelou que os ratos expostos a 5 minutos de primeira exposição apresentaram maior número de entradas nos braços abertos ( $p < 0,05$ ), fechados ( $p < 0,05$ ), e conseqüentemente total ( $p < 0,001$ ), quando comparados ao grupo exposto a 1 minuto de primeira exposição; além disso, a primeira exposição de 5 minutos induziu menor número de entradas nos braços abertos na segunda exposição ( $p < 0,05$ ), mas não diminuiu o número de entradas nos braços fechados e o total de entradas durante a segunda exposição.



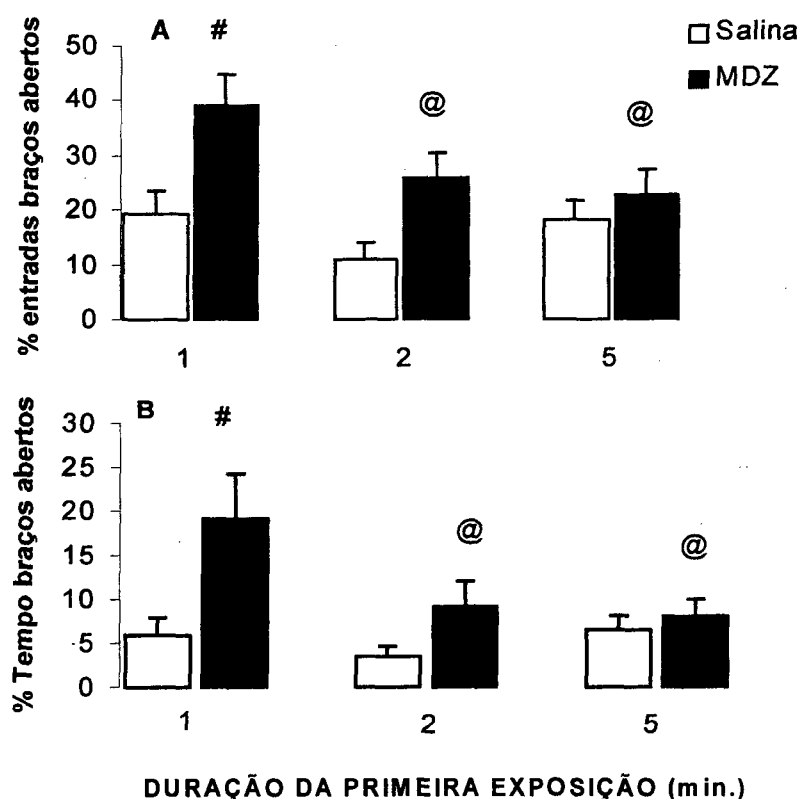
**FIGURA 5.** Número de entradas nos braços abertos (A), braços fechados (B) e total de entradas (C) na primeira exposição (E1) com duração de 5, 2 ou 1 minutos, e segunda exposição (E2) de 5 minutos ao labirinto em cruz elevado, com administração de salina previamente à E2. Dados apresentados na forma de média mais E.P.M.: \* $p < 0,05$  com relação à primeira exposição; # $p < 0,05$  e ##  $p < 0,001$  com relação à primeira exposição de 1 minuto. (Two-Way ANOVA seguida do Teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações)

A figura 6 apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T; gráfico B) de ratos não tratados, submetidos à primeira exposição (E1) com duração de 5, 2 ou 1 minutos, e após 24 horas, tratados com midazolam ou salina (i.p.) 30 minutos antes da segunda exposição (E2) ao labirinto em cruz elevado (LCE). O teste de Newman-Keuls revelou que no grupo com primeira exposição de 1 minuto, o tratamento com Midazolam prévio à segunda exposição induziu aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos (%A;  $p < 0,05$ ) e na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T;  $p < 0,05$ ) na segunda exposição, quando comparado ao grupo tratado com salina. Nos grupos cuja primeira exposição ao LCE foi de 2 ou 5 minutos, o Midazolam não alterou a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A) e tempo despendido nos braços abertos (%T) na segunda exposição, em comparação ao grupo salina. Além disso, a %A e %T mostraram-se diminuídas na segunda exposição nos grupos submetidos à E1 de 2 e 5 minutos ( $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo submetido à primeira exposição de 1 minuto tratado com Midazolam previamente à segunda exposição.

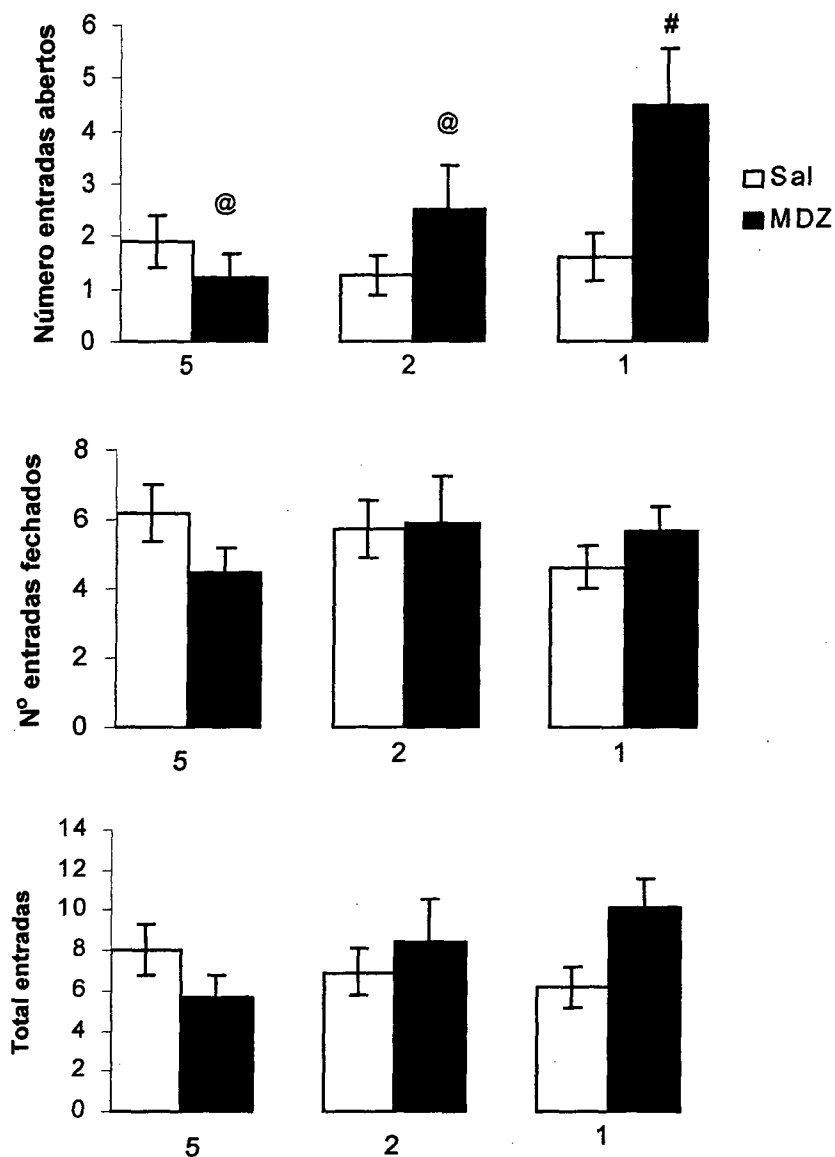
A figura 7 mostra o número de entradas nos braços abertos, fechados, e o total de entradas dos ratos expostos a E1 de 1, 2 ou 5 minutos, e tratados com salina ou midazolam 30 minutos antes da segunda exposição. O teste de Newman-Keuls revelou que no grupo submetido a um minuto de primeira exposição, o tratamento com midazolam aumentou o número de entradas nos braços abertos durante a segunda exposição, com relação ao grupo tratado com salina ( $p < 0,05$ ), enquanto o número de entradas nos braços fechados e

total permaneceram inalterados. Nos grupos submetidos à primeira exposição de 2 ou 5 minutos, que receberam midazolam previamente à segunda exposição, o número de entradas nos braços abertos encontrou-se diminuído, quando comparado ao grupo MDZ exposto a 1 minuto de E1 ( $p < 0,05$ ).

Todos os dados são apresentados na forma de média e desvio padrão, nos anexos 1, 2, 3, 4 e 5.



**FIGURA 6.** O gráfico apresenta a média  $\pm$ E.P.M da porcentagem de entradas nos braços abertos (%A; gráfico A) e porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%T; gráfico B). Ratos foram inicialmente submetidos a uma exposição com duração de 1, 2 ou 5 minutos. Previamente à segunda exposição, os animais foram tratados com salina ou midazolam (1,5mg/kg) i.p.. Two-Way ANOVA seguida do Teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações: <sup>#</sup> $p < 0,05$  com relação ao grupo salina; <sup>@</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo com primeira exposição de 1 minuto.



#### DURAÇÃO DA PRIMEIRA EXPOSIÇÃO (min)

**FIGURA 7.** Número de entradas nos braços abertos (A) e fechados (B) e total de entradas (C). Ratos foram inicialmente submetidos a uma exposição com duração de 1, 2 ou 5 minutos. Previamente à segunda exposição, os animais foram tratados com salina ou midazolam (1,5mg/kg) i.p.. Two-Way ANOVA seguida do Teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações: #p<0,05 com relação ao grupo salina; @p<0,05 em relação ao grupo com primeira exposição



de 1 minuto.

Os dados referentes à primeira *versus* segunda exposições dos grupos que receberam MDZ previamente à segunda exposição não são apresentados na forma de gráfico devido à existência de duas variáveis independentes: a administração ou não de droga (realizada apenas previamente à E2), e a exposição (primeira X segunda).

Todos os dados obtidos são apresentados na forma de média e desvio padrão em tabelas, nos Anexos 1, 2, 3, 4 e 5.

## DISCUSSÃO

---

## CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO

As hipóteses para a perda de efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos na segunda exposição ao LCE têm variado entre “one-trial tolerance”, ou seja, tolerância à droga (FILE, 1990), habituação locomotora (DAWSON *et al.*, 1994), e uma mudança de ansiedade experimental na segunda exposição (FILE & ZANGROSSI, 1993a e 1993b), contra a qual os benzodiazepínicos não são clinicamente efetivos. Análise fatorial tem mostrado que os índices de ansiedade referentes à primeira e à segunda exposição ao LCE são matematicamente fatores independentes (FILE *et al.*, 1993).

A análise minuto a minuto do comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado realizada em nosso laboratório (ROSA *et al.*, 2000) e de camundongos, realizada por RODGERS (1996) mostrou significativa redução na exploração dos braços abertos (tanto em porcentagem de tempo, quanto de entradas nos braços abertos) no labirinto nos minutos finais da primeira exposição, assim como em todos os minutos da segunda exposição. Além disso, a ação do midazolam (MDZ), cujo efeito ansiolítico reflete-se no aumento da exploração dos braços abertos do labirinto, decai a partir do terceiro minuto (ROSA *et al.*, 2000), além de perder efeito na segunda exposição ao labirinto (FILE, 1990).

A diminuição da exploração dos braços abertos e a perda do efeito ansiolítico no decorrer da sessão experimental (ROSA *et al.*, 2000) e nas subseqüentes exposições (FILE, 1990) têm sido consideradas, então,

decorrentes de um aprendizado desenvolvido durante a primeira exposição do animal ao labirinto (FILE, 1993c; ROSA *et al.*, 2000).

No presente estudo, a comparação dos grupos que receberam salina não mostrou diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos e na porcentagem de tempo nos braços abertos tanto comparando-se as primeiras exposições, quanto comparando as segundas exposições, o que sugere semelhante nível de ansiedade entre os grupos em ambas as exposições. Entretanto, comparando-se a primeira com a segunda exposição de cada grupo, observou-se que nos grupos submetidos a cinco ou dois minutos de primeira exposição ao LCE, houve diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos (significativamente apenas no grupo 2 minutos) e na porcentagem de tempo nos braços abertos na segunda exposição. Estes dados sugerem um maior nível de ansiedade na segunda exposição, provavelmente devido a uma aprendizagem durante a primeira exposição. (FILE & ZANGROSSI, 1993b; RODGERS, 1996; ROSA *et al.*, 2000; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000).

A modificação na porcentagem de entradas nos braços abertos da primeira exposição de dois minutos para a segunda exposição corrobora os resultados obtidos por RODGERS (1996) em experimento com camundongos, destacando a importância dos minutos iniciais no aumento da esquia e ausência de efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos na segunda exposição ao LCE.

Em nosso estudo, no grupo submetido a um minuto de primeira exposição verificou-se apenas diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos. Observando a porcentagem de entradas nos braços abertos,

no mesmo grupo, podemos verificar a manutenção do comportamento da primeira para a segunda sessão, o que pode suscitar dúvidas sobre a ocorrência do aprendizado de aumento da esquivas dos braços abertos com apenas um minuto de primeira exposição.

Como as drogas benzodiazepínicas perdem seu efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado a partir do terceiro minuto de exposição (ROSA *et al.*, 2000) e são inefetivas na segunda exposição ao labirinto (FILE, 1990), os animais foram submetidos à administração sistêmica de midazolam (MDZ) previamente à segunda exposição, associada à redução no tempo de primeira exposição. Com isto objetivamos verificar se essa redução no tempo de primeira exposição impediria ou não o aprendizado que se reflete na perda de efeito do midazolam. Verificamos, assim, que os animais que tiveram seu tempo de exposição ao labirinto reduzido para um minuto na primeira exposição apresentaram efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição, ou seja, maior porcentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos na segunda exposição, com relação ao controle. Essa presença de efeito ansiolítico do midazolam sugere não haver ocorrido o aprendizado na primeira exposição de apenas um minuto.

A presença de efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição associada ao fato de não haver redução na exploração dos braços fechados na segunda exposição, demonstra também não ter ocorrido habituação locomotora no labirinto. Isso corrobora a literatura, pois estudos demonstram que além de não ocorrer diminuição no número de entradas nos braços fechados na segunda exposição, não há adaptação na liberação de corticosterona (FILE *et al.*, 1994; FILE *et al.*, 1999).

Segundo BERTOGLIO & CAROBREZ (2000), a exploração dos dois tipos de braços do labirinto (abertos e fechados) em uma mesma exposição é essencial para o aprendizado no labirinto. Assim, a expressão de ansiedade no labirinto não está relacionada apenas à aversividade dos braços abertos, mas sim ao conflito gerado pela comparação, entre a pulsão de exploração e de esquiva. É possível, então, que a ausência do aumento da esquiva dos braços abertos e a presença de efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição, verificado nos animais com apenas um minuto de primeira exposição, seja devido à menor possibilidade de exploração, e conseqüentemente de comparação, entre dos braços abertos e fechados do labirinto.

Segundo FILE *et al.* (1999), na primeira exposição, a principal fonte de aversividade é a natureza dos braços abertos, porém na segunda exposição, a altura do labirinto seria o fator aversivo. O núcleo basolateral da amígdala tem sido considerado o substrato neural para aquisição e consolidação da informação adquirida durante a primeira exposição (FILE *et al.*, 1998). LAMPREA *et al.* (2000) demonstrou que animais com lesão no septo não apresentam modificações no comportamento na primeira exposição ao LCE, porém na segunda exposição demonstram menores índices de ansiedade que os controles. Isso sugere que a lesão do septo interfere no aprendizado sobre o ambiente (no caso o labirinto) durante a primeira sessão. Assim, o sistema septo-hipocampal parece envolvido na aquisição e consolidação das mudanças comportamentais da primeira para a segunda exposição ao labirinto em cruz elevado.

O fato de um minuto de primeira exposição ser insuficiente para a aquisição do aprendizado no LCE, evidenciando presença de efeito ansiolítico

do midazolam no LCE na segunda exposição, corrobora a literatura no que diz respeito à ausência de tolerância à droga a partir da segunda exposição (FILE & ZANGROSSI, 1993b; RODGERS *et al.*, 1996; ROSA *et al.*, 2000; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; TREIT *et al.*, 1993), e reforça a necessidade de modificação e não-utilização do termo "*One-trial tolerance*" como descritivo do fenômeno.

A literatura tem proposto que o aumento da esquia dos braços abertos e a ausência de efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição são frutos do aprendizado de um medo condicionado, possivelmente um estado fóbico (FILE & ZANGROSSI, 1993b; FILE, ZANGROSSI, VIANA & GRAEFF, 1993c; FILE, GONZALEZ, L.E. & GALLANT, 1998). Assim, nossos resultados corroboram a literatura no que diz respeito à atribuição do fenômeno a uma modificação intrínseca ao animal, o aprendizado (condicionamento). Através da delimitação de nosso estudo verificamos uma alteração funcional do organismo, necessária à sobrevivência do animal. Este estudo não nos permite realizar correlação com um ou outro distúrbio de ansiedade verificado na clínica.

A análise temporal, ou curva de aprendizado verificada através da redução do tempo do animal ao labirinto na primeira exposição indica que o Labirinto em Cruz elevado, assim como o labirinto em "T" elevado, pode ser uma ferramenta para o estudo de aprendizado e memória emocional.

## CONCLUSÃO

---



## **CAPÍTULO V – CONCLUSÃO**

- ø Reduzido tempo de exploração do LCE impede a aquisição do aprendizado do aumento da esquia dos braços abertos em ratos na segunda exposição.
- ø O Midazolam apresenta efeito ansiolítico na segunda exposição quando a redução no tempo de exploração do LCE impede a aquisição do aumento da esquia dos braços abertos.
- ø O aumento da esquia dos braços abertos e ausência de efeito ansiolítico do midazolam na segunda exposição ao LCE podem ser decorrentes de aprendizagem emocional durante a primeira exposição a LCE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV), 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC: APA Press, 1994.

BECHARA, A.; DAMASIO, H.; DAMASIO, A. R.; LEE, G. P. Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. *The Journal of Neuroscience*, July 1, 19 (13):5473-5481, 1999.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108: 197-203, 2000

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann. Rev Psychology* 39:43-68, 1988.

CHEETA, S; KENNY, P; FILE, S. E. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog. Neuro-psychopharmacology & Biologic Psychiatry*, 24: 1053-1067, 2000.

CRAIG, K. J.; BROWN, K. J.; BAUM, A. Environmental factors in the etiology of anxiety. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, 1995. Cap. 112 P. 1325-1339, 1995.

DAMÁSIO, A. R. *O erro de Descartes: emoção, razão e o cérebro humano*. São Paulo: Companhia das Letras, 1996. 330p.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the use of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology* 113:570-2, 1994.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Neuroscience* 16:33, 1995.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*: 23: 743-760, 1999.

FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100:281-282, 1990.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In : ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C.A. Experimental approaches to anxiety and depression. Capítulo 3. John Willey & Sons, 1992.

FILE, S.E. e ZANGROSSI, H.; VIANA, M.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111:491-4, 1993.

FILE, S.E. e ZANGROSSI, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 10: 240-244, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, J. R. H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113: 543-6, 1994.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E. & GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 19: 397-405, 1998.

FILE, S. E.; KENNY, P. J.; CHEETA, S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 66: 65-72, 2000.

GALLAGHER, M.; CHIBA, A. A. The amigdala and emotion. *Current opinion in Neurobiology*, 6(2): 221-227, 1996.

GEYER, M. A. & MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. New York: Raven Press, Cap. 68 p. 787-798, 1995.

GRAEFF, F. G. Brain defence systems and anxiety. In: Handbook of anxiety, The neurobiology of anxiety, ed. By G. D. Burrows, M. Routh & R. Noyes pp307-354, Elsevier, Amsterdam, 1990.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27:811-829, 1994.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. Neurobiologia das doenças mentais. Cap. V. 3. Ed. São Paulo: Lemos, P. 109-144, 1996.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo: Lemos, P. 135-177, 1999c.

GRAEFF, F. G. Bases Psicológicas. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos da Psicofarmacologia. Cap III. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, Pp 43-52, 1999a.

GRAEFF, F. G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos da Psicofarmacologia. Cap VII. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, Pp 123-160, 1999b.

GRAY, J.A. Précis of The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behavioral and Brain Sciences* 5: 469-534, 1982.

GREBA, Q.; GIFKINS, A. ; KOKKINIDIS, L. Inhibition of amygdaloid dopamine D<sub>2</sub> receptors impairs emotional learning measured with fear potentiated startle. *Brain Research*, 899: 218-226, 2001.

HANDLEY, S. L. & MITHANI, S.: Effects of  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 307:1-5, 1984.

KLUVER, H.; BUCY, P. C. Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. *Biol. Psychiatry* 42: 461-471, 1939.

LABAR, K. S.; LEDOUX, J. E.; SPENCER, D. D.; PHELPS, E. A. Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J. Neurosci.* 15, 10: 6846-6855, 1995.

LAMPREA, M. R.; CARDENAS, F. P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T. J. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav. Brain. Res.* 117:97-105, 2000.

LEDOUX, E. J. The neural circuits underlying anxiety and fear: fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol. Psychiatry*, 44:1229-1238, 1998.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180-185; 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.*, 46: 321-340; 1990.

MANNING, A. Introdução ao comportamento animal. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1977.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by a novel stimulation and exploratory behaviour. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 48: 254-260, 1955.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M., Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neuroscience Methods*, 14, 149-167, 1985.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A-S.; MCNAMARA, J. O. Emotions In: Neuroscience. Sunderland: Sinauer Associates, Cap. 27. P. 513 - 527, 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R. & KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 54:41-50; 1996.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30:289-304, 1997.

ROSA, V.P.; VANDRESEN, N.; CALIXTO, A. V.; KOVALESKI, D. F.; FARIA, M. S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 67:177-182, 2000.

TREIT, D.; MENARD, J; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 44:463-469; 1993.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83: 1-16, 1984.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134: 3199-329, 1997.

## ANEXO 1

**Porcentagem de entradas nos braços abertos.** Os dados referem-se à média e o desvio padrão. As colunas apresentam: a duração da primeira exposição; se os resultados referem-se à primeira ou à segunda exposição; se o animal recebeu salina ou MDZ (1,5mg/Kg) previamente à segunda exposição; porcentagem de entradas nos braços abertos (média) e o desvio padrão.

Duração	E1 ou E2	Droga ou salina	%ABERTOS	Desvio
E1		previamente à E2	Média	padrão
1	E 1	sal	25,60000	18,16512
1	E 2	sal	19,20000	15,78064
1	E 1	mdz	41,07143	24,07828
1	E 2	mdz	38,92857	21,42416
2	E 1	sal	34,52941	21,82063
2	E 2	sal	11,11765	12,03579
2	E 1	mdz	39,25000	13,00275
2	E 2	mdz	25,75000	12,22118
5	E 1	sal	33,41177	17,37116
5	E 2	sal	18,17647	14,50963
5	E 1	mdz	31,40000	11,62387
5	E 2	mdz	22,60000	17,59789



ANEXO 2

**Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos.** Os dados referem-se à média e o desvio padrão. As colunas apresentam: a duração da primeira exposição; se os resultados referem-se à primeira ou à segunda exposição; se o animal recebeu salina ou MDZ (1,5mg/Kg) previamente à segunda exposição; porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (média) e o desvio padrão.

Duração E1	E1 ou E2	Droga ou salina previamente à E2	%TEMPO Média	Desvio padrão
1	E 1	sal	23,00000	17,01680
1	E 2	sal	6,93333	7,33355
1	E 1	mdz	28,85714	22,47685
1	E 2	mdz	19,14286	18,67478
2	E 1	sal	22,00000	17,14278
2	E 2	sal	3,47059	4,69198
2	E 1	mdz	31,62500	15,72929
2	E 2	mdz	9,12500	8,11414
5	E 1	sal	15,11765	13,52721
5	E 2	sal	6,47059	6,62493
5	E 1	mdz	17,40000	10,62208
5	E 2	mdz	8,00000	7,94625

**ANEXO 3**

**Número de entradas nos braços fechados.** Os dados referem-se à média e o desvio padrão. As colunas apresentam: a duração da primeira exposição; se os resultados referem-se à primeira ou à segunda exposição; se o animal recebeu salina ou MDZ (1,5mg/Kg) previamente à segunda exposição; número de entradas nos braços fechados (média) e o desvio padrão.

Duração E1	E1 ou E2	Droga ou salina previamente à E2	FECHADOS Média	Desvio padrão
1	E 1	sal	3,066667	1,032796
1	E 2	sal	4,600000	2,354327
1	E 1	mdz	2,214286	,892582
1	E 2	mdz	5,642857	2,706321
2	E 1	sal	4,176471	1,590412
2	E 2	sal	5,705883	3,513629
2	E 1	mdz	5,125000	1,552647
2	E 2	mdz	5,875000	3,907411
5	E 1	sal	6,705883	2,494111
5	E 2	sal	6,176471	3,450277
5	E 1	mdz	7,333333	2,410295
5	E 2	mdz	6,000000	3,585686

**ANEXO 4**

**Número de entradas nos braços abertos.** Os dados referem-se à média e o desvio padrão. As colunas apresentam: a duração da primeira exposição; se os resultados referem-se à primeira ou à segunda exposição; se o animal recebeu salina ou MDZ (1,5mg/Kg) previamente à segunda exposição; número de entradas nos braços abertos (média) e o desvio padrão.

Duração E1	E1 ou E2	Droga ou salina previamente à E2	ABERTOS Média	Desvio padrão
1	E 1	sal	1,266667	1,032796
1	E 2	sal	1,600000	1,723783
1	E 1	mdz	1,714286	1,138729
1	E 2	mdz	4,500000	3,838068
2	E 1	sal	2,352941	1,497547
2	E 2	sal	1,235294	1,562426
2	E 1	mdz	3,375000	1,505941
2	E 2	mdz	2,500000	2,390457
5	E 1	sal	3,823529	2,674773
5	E 2	sal	1,882353	2,027386
5	E 1	mdz	3,466667	1,807392
5	E 2	mdz	2,133333	1,884776

**ANEXO 5**

**Número total de entradas.** Os dados referem-se à média e o desvio padrão. As colunas apresentam: a duração da primeira exposição; se os resultados referem-se à primeira ou à segunda exposição; se o animal recebeu salina ou MDZ (1,5mg/Kg) previamente à segunda exposição; número total de entradas (média) e o desvio padrão.

Duração E1	E1 ou E2	Droga ou salina previamente à E2	TOTAL ENTRADAS	Desvio padrão
			Média	
1	E 1	sal	4,33333	1,676163
1	E 2	sal	6,20000	3,820995
1	E 1	mdz	3,92857	1,206666
1	E 2	mdz	10,14286	5,186627
2	E 1	sal	6,58824	2,152290
2	E 2	sal	6,94118	4,840849
2	E 1	mdz	8,50000	2,203893
2	E 2	mdz	8,37500	6,116430
5	E 1	sal	10,52941	4,288322
5	E 2	sal	8,05882	5,177724
5	E 1	mdz	10,20000	4,074310
5	E 2	mdz	8,13333	5,012366